

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 715 939

②1 N° d'enregistrement national : 94 01531

⑤1 Int Cl^e : C 12 N 7/01, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68, A 61 K 38/16,
C 07 K 14/15

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 04.02.94:

③0 Priorité :

⑦1 Demandeur(s) : Société anonyme dite: BIO MERIEUX
— FR.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 11.08.95 Bulletin 95/32.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦2 Inventeur(s) : Perron Hervé, Mallet François,
Mandrand Bernard, Bedin Frédéric et Beseme
Frédéric.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Germain et Maureau.

⑤4 Virus MSRV2 associé à la sclérose en plaques, et ses constituants nucléiques.

⑤7 L'invention concerne un virus, possédant une activité transcriptase inverse, associé à la sclérose en plaques, contenu dans une souche virale possédant une activité transcriptase inverse, choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 29.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, et MS7PG déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, autre que le virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, associé à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, contenu dans chacune des mêmes souches, et parmi les souches variantes consistant en des virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre desdits virus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées, autre que le virus humain.

L'invention concerne, en outre, les constituants nucléiques dudit virus et leurs utilisations.

FR 2 715 939 - A1



La sclérose en plaques (SEP) est une maladie démyélinisante du système nerveux central (SNC) dont la cause reste encore inconnue .

De nombreux travaux ont étayé l'hypothèse d'une
5 étiologie virale de la maladie, mais aucun des virus connus testés ne s'est avéré être l'agent causal recherché : une revue des virus recherchés depuis des années dans la SEP a été faite par E. Norrby (Prog. Med. Virol., 1978 ; 24, 1-39) et R.T. Johnson (dans "Handbook of
10 clinical neurology, 47 Demyelinating diseases". Vinken P. et Bruyn G.W., eds. Amsterdam, Elsevier science Publishing, 1985, 319-336). Parallèlement, la possibilité d'un facteur exogène et/ou infectieux est suggérée par l'existence d'épidémies localisées ou "clusters" de SEP
15 comme ce qui a été observé dans les Iles Feroes entre 1943 et 1960 (Cook 1980), en Sardaigne (Rosati, 1988), en Norvège (Riisse, 1991), ainsi que par les études sur les migrants (Elian, 1990). Parmi tous les facteurs exogènes suggérés, les virus ont été étudiés le plus souvent et une
20 étiologie virale est classiquement évoquée.

L'observation, dans la SEP, de phénomènes assimilables à une réaction d'auto-immunité a conduit à une hypothèse étiologique auto-immune "essentielle" (voir : Lisak R.P., Zweiman B. New Engl. J. Med. 1977 ;
25 297, 850-853, et, Lassmann H. et Wisniewski H.M. Arch. Neurol. 1979 ; 36, 490-497). Cependant, cette auto-immunité dirigée contre certains composants du SNC s'est révélée peu spécifique de la SEP et fréquente dans les inflammations du SNC, associées ou non à une infection,
30 ainsi que cela a été montré par Hirayama M. et coll. (Neurology 1986 ; 36, 276-8), Kenneth G. Warren et coll. (Annals of Neurology 1986 ; 20, 20-25), Suzumura A. et coll. (Journal of Neuroimmunology 1986 ; 11, 137-47), et, Tourtelotte W. et coll. (Journal of Neurochemistry 1986 ;
35 46, 1086-93). De plus, comme l'a fait remarquer E.J. Field (The Lancet 1989 ; I, 1272.) aucune des thérapeutiques

- immunosuppressives n'a permis d'obtenir des résultats décisifs contre la SEP. Il semble maintenant probable que les manifestations "auto-immunes" sont induites par un mécanisme d'origine virale : co-sensibilisation à des déterminants viraux associés à des molécules d'origine cellulaire, phénomènes de mimétisme moléculaire -comme cela a été décrit par Fujinami R.S et Oldstone M.B.A (dans "Molecular mimicry : Cross-reactivity between microbes and host proteins as a cause of autoimmunity". Oldstone M.B.A., ed.. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 145, Berlin, Springer-Verlag, 1989)- ou, selon P. Rudge (Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 1991 54, 853-855), par expression de superantigènes rétroviraux .
- Des travaux ont étayé une hypothèse selon laquelle un Rétrovirus serait à l'origine de la maladie : la découverte récente par A. Gessain et coll. (J. Infect. Disease 1988 ; 1226-1234), de syndromes neurologiques associés au virus HTLV-I, connu à l'origine comme agent de leucémies T de l'adulte, a conduit de nombreux auteurs, tels que H. Koprowski et coll. (Nature 1985 ; 318, 154), M.Ohta et coll. (J. Immunol. 1986 ; 137, 3440), E. P. Reddy et coll. (Science 1989 ; 243, 529), S.J. Greenberg et coll. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989 ; 86, 2878), J.H. Richardson et coll. (Science 1989 ; 246, 821), S.L. Hauser et coll. (Nature 1986 ; 322, 176) et A. Karpas et coll. (Nature 1986 ; 322, 177), à rechercher une implication de ce rétrovirus humain dans la SEP, cependant sans succès ou avec des résultats évoquant des réactions croisées.
- Par ailleurs, il existe un modèle animal très proche de la SEP, induit par un rétrovirus : le virus MAEDI-VISNA du mouton . Il est connu que l'infection naturelle par ce virus peut provoquer deux types de maladies chez cet animal : le Maedi, une pneumonie interstitielle lymphocytaire qui peut survenir lors de la primo-infection par ce rétrovirus et une pathologie

neurologique démyélinisante tardive suivant généralement une phase de latence prolongée, le Visna. La physiopathologie du Visna naturel concorde avec la plupart des données cliniques et biologiques de la SEP, comme le rapportent Johnson R.T. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 66-67), Narayan O. et Cork L.C. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 89-98), et Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 75-82). L'infection expérimentale des moutons par inoculation intra-ventriculaire de souches neurovirulentes du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce virus dans la genèse de cette affection démyélinisante du mouton. Comme l'expliquent Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 75-82), Hoffman P.M. et Panitch H.S. (dans, "Handbook of clinical neurology, 12 : Viral diseases" R.R. Mc Kendall, ed.. Elsevier science Publishing, Amsterdam, 1989 , p 453-466), et A. Haase (Nature 1986 ; 322, 130-136), elle diffère de l'infection naturelle par ses conséquences neuropathologiques exacerbées, mais reste proche de la SEP. Il est de plus notable que, dans l'ensemble des travaux effectués sur ce sujet par les auteurs précités, notamment, le virus Visna est régulièrement retrouvé dans les cellules de plexus choroïdes du cerveau qui constituent un site de latence et de réplication occasionnelle du provirus Visna ; la localisation de ces cellules à l'interface sang/liquide céphalo-rachidien (LCR) explique certainement ce phénomène.

Récemment, un rétrovirus, différent des rétrovirus humains connus a été isolé chez des patients atteints de SEP par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561 / dans : "Current concepts in multiple sclerosis" Wiethölter et coll., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, p. 111-116 / The Lancet 1991 ; 337, 862-863). Les auteurs ont aussi pu montrer que ce rétrovirus pouvait être transmis in vitro, que des patients atteints de SEP produisaient des anticorps susceptibles de reconnaître des

protéines associées à l'infection des cellules leptoméningées par ce rétrovirus et que l'expression de ce dernier pouvait être fortement stimulée par les gènes immédiats-précoces de certains herpesvirus (Perron et coll. Herpes simplex virus ICP0 and ICP4 immediate-early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell-line from multiple sclerosis.1993. J. Gen. Virol. 74 ; 65-72).

Tous ces résultats plaident en faveur du rôle dans la SEP d'au moins un rétrovirus inconnu ou d'un virus ayant une activité transcriptase inverse détectable selon la méthode publiée par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561) et qualifiée d'activité "RT de type LM7".

Récemment, les travaux de la demanderesse ont permis d'obtenir deux lignées continues de cellules infectées par des isolats naturels provenant de deux patients différents atteints de SEP, par un procédé de culture tel que décrit dans la demande de brevet n° WO 93/20188. Ces deux lignées dérivées de cellules de plexus-choroïdes humains, dénommées LM7PC et PLI-2 ont été déposées à l'ECACC respectivement le 22 juillet 1992 et le 8 janvier 1993, sous les numéros 92072201 et 93010817, conformément aux dispositions du traité de Budapest. Par ailleurs, les isolats viraux possédant une activité RT de type LM7 ont également été déposés à l'ECACC sous la dénomination globale de "souches". La "souche" ou isolat hébergé par la lignée PLI-2, dénommée POL-2, a été déposée le 22 juillet 1992 sous le n° V92072202. La "souche" ou isolat hébergé par la lignée LM7PC, dénommée MS7PG, et a été déposée le 8 janvier 1993 sous le n° V93010816.

A partir des cultures et des isolats précités, caractérisés par des critères biologiques et morphologiques, on s'est ensuite attaché à caractériser le matériel nucléaire associé aux particules virales produites dans ces cultures.

Ainsi les objets de la présente invention sont les suivants :

- 5 - un virus, possédant une activité transcriptase inverse, associé à la sclérose en plaques, contenu dans une souche virale possédant une activité transcriptase inverse, choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, et MS7PG déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès
10 V93010816, autre que le virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, et dont au moins une partie de la séquence POL présente une homologie avec la même région POL du virus endogène ERV9 ou HSERV9, contenu dans chacune des mêmes souches, et parmi les souches
15 variantes consistant en des virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre desdits virus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées, autre que le virus humain précité.
- 20 - un virus, possédant une activité transcriptase inverse, associé à la sclérose en plaques, produit par une lignée cellulaire choisie parmi les lignées cellulaires dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201 et LM7PC
25 déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, autre que le virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, et dont au moins une partie de la séquence POL présente une homologie avec la même région POL du virus endogène ERV9 ou HSERV9, produit
30 par chacune des mêmes lignées, et parmi les cultures cellulaires infectées susceptibles de produire un virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus produits par
35 les lignées PLI-2 et LM7PC précitées, autre que le virus humain précité.

- un virus dont le génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique SEQ ID N01, décrite à la Fig 1, ou sa séquence
5 complémentaire.

- un virus dont le génome code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie, avec une séquence peptidique codée par la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence
10 complémentaire.

- un fragment nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec la SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

15 - un fragment préférentiel de l'invention consistant en une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie, avec la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

20 - un ARN ou ADN et notamment vecteur de réplication, comprenant un fragment de l'invention.

- une amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN spécifique d'un virus associé à la sclérose en plaques, comprenant une séquence
25 nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie, avec au moins une partie d'un fragment de l'invention.

- une amorce préférentielle ayant de 10 à 30 nucléotides.

30 - une sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou un ADN spécifique d'un virus associé à la sclérose en plaques, comprenant une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie, avec au moins une partie d'un
35 fragment de l'invention.

- une sonde préférentielle ayant au moins 10 nucléotides.

- une utilisation d'une sonde de l'invention ou d'une amorce de l'invention, pour détecter et/ou
5 identifier, dans un échantillon biologique, un virus associé à la sclérose en plaques.

- une composition thérapeutique antisens notamment pour le traitement de la sclérose en plaques, comprenant au moins une séquence nucléotidique de l'invention.

10 - un procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, à au moins une sonde de l'invention.

15 - un procédé préférentiel de l'invention caractérisé en ce que, avant d'exposer l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce de l'invention et on amplifie ledit ARN et/ou ADN.

20 - un peptide codé par la séquence nucléotidique du génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, et codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique de l'invention.

- une protéine comprenant un peptide de
25 l'invention.

- un oligopeptide comprenant au moins cinq aminoacides contigus du peptide de l'invention.

- une composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, comprenant au moins un
30 peptide de l'invention, ou au moins une protéine de l'invention ou au moins un oligopeptide de l'invention.

- une composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend un ligand spécifique à un peptide de
35 l'invention, ou à une protéine de l'invention, ou à un oligopeptide de l'invention.

Avant de détailler l'invention, différents termes utilisés dans la description et les revendications sont à présent définis :

- selon l'invention, un fragment nucléotidique ou
5 un oligonucléotide est un enchaînement de monomères, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à un fragment nucléotidique dans des conditions prédéterminées, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de
10 structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

- ainsi un monomère peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs
15 sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée; dans l'ARN le sucre est le ribose, dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine; ou un
20 nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-
25 désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine et toute autre base modifiée favorisant l'hybridation, au niveau du sucre à savoir le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991)), au niveau du
30 groupement phosphate par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de phosphorothioate,

- par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de monomères, dont la nature chimique et
35 l'ordre dans un sens de référence constituent une

information de même qualité que celle des acides nucléiques naturels,

- par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments
5 nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires, s'apparient pour former un double brin,

- une sonde est un fragment nucléotidique comprenant au moins 10 monomères, avantageusement de 10 à 50 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans
10 des conditions déterminées. Une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic telles que les sondes de capture et/ou de détection ou à des fins de thérapie,

- la sonde de capture peut être immobilisée sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire
15 directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption passive,

- la sonde de détection est marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi les isotopes radioactifs, des enzymes notamment choisis parmi la peroxydase et la
20 phosphatase alcaline et ceux susceptibles d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et la biotine,

25 - les sondes utilisées à des fins de diagnostic de l'invention peuvent être mises en oeuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues et notamment les techniques dites "DOT-BLOT" (MANIATIS et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982), "SOUTHERN BLOT"
30 [SOUTHERN. E.M., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975), "NORTHERN BLOT" qui est une technique identique à la technique "SOUTHERN BLOT" mais qui utilise de l'ARN comme cible, la technique SANDWICH (DUNN A.R., HASSEL J.A., Cell, 12, 23 (1977)) ; avantageusement, on utilise la technique
35 SANDWICH dans la présente invention comprenant une sonde de capture spécifique et/ou une sonde de détection

spécifique, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent présenter une séquence nucléotidique au moins partiellement différente,

- une autre application de l'invention est une sonde de thérapie, ladite sonde étant susceptible de s'hybrider in vivo sur l'ARN et/ou sur l'ADN pour bloquer les phénomènes de traduction et/ou de transcription,

- une amorce est une sonde comprenant de 10 à 30 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé d'élongation, tel que le séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou analogue,

- l'homologie caractérise le degré de similitude de deux fragments nucléotidiques comparés.

Etant donné qu'un virus possédant une activité enzymatique transcriptase inverse peut être génétiquement caractérisé aussi bien sous forme d'ARN que d'ADN, il sera fait mention aussi bien de l'ADN que de l'ARN viral pour caractériser les séquences relatives à un virus possédant une telle activité transcriptase inverse.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre, faite en référence aux figures annexées dans lesquelles :

- la figure 1 représente la séquence de type MSRV-2A obtenue à partir des cultures LM7 selon le protocole de Shih et col. (J. Virol. 1989 ; 63, 64-75),

- la figure 2, correspond à l'alignement d'une séquence protéique MSRV-2A obtenue à partir de la culture LM7 avec des séquences protéiques rétrovirales connues ; les acides aminés conservés entre le produit d'amplification (Trad pol SHIH) et certains rétrovirus sont soulignés dans l'alignement. Cette séquence est très éloignée de tous les rétrovirus connus à ce jour, en

particulier de HTLV, notamment par la présence d'une délétion dans la région 5',

- la figure 3, donne un exemple de consensus pour des séquences de MSRV-2B,

5 - la figure 4 représente la définition d'une séquence consensus de type MSRV-2B selon Fig 4A, une définition d'une trame de lecture fonctionnelle selon Fig 4B, une répétition de l'amorce 3' selon Fig 4C et une séquence comprise entre VLPQG et YVDD selon Fig 4D,

10 - la figure 5, représente une analyse comparée des séquences nucléiques (Fig 5A) et protéiques (Fig 5B), de type MSRV-2 obtenues à partir des cultures LM7, LM7PC et PLI-2 et des lymphocytes B d'un patient atteint de SEP, selon le protocole original ou modifié de Shih et col., avec LigT4
15 correspondant à une séquence obtenue à partir des lignées, selon le protocole modifié, LBpatDuT4 correspondant à une séquence obtenue à partir des lignées, selon le protocole modifié et polSHIH correspondant à une séquence obtenue à partir des lignées, selon le protocole original,

20 - la figure 6, correspond à un alignement d'une séquence protéique MSRV-2B (avec une ou deux amorces 3') avec des séquences protéiques rétrovirales connues ; les acides aminés conservés (1ère ligne) entre le consensus MSRV-2B et certains rétrovirus sont soulignés dans
25 l'alignement ; cette séquence est très éloignée de tous les rétrovirus connus à ce jour, en particulier de HTLV, notamment par la présence d'une délétion dans la région 5' et d'un site actif YVDD et non YMDD,

 - la figure 7, est une représentation de
30 l'activité transcriptase inverse dans les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification de virions produits dans les lymphocytes B, en culture, chez un patient atteint de SEP (L'activité transcriptase inverse (RT) en dpm (désintégrations par minute) est
35 représentée en ordonnée. Les numéros des fractions sont représentés en abscisse),

- la figure 8, est une représentation de l'activité transcriptase inverse, comme dans la figure 7, mais obtenue à partir d'une culture de lymphocytes B d'un témoin exempt de SEP, et

5 - la figure 9, illustre les séquences consensus et majoritaires de MSRV-2B obtenues à partir des lymphocytes B d'un patient atteint de SEP, selon Fig 9A, avec :

 * MAJ correspondant à la séquence majoritaire dans laquelle les bases conservées dans tous les cas sont
10 représentées par ATGC, les bases majoritaires sont représentées par atgc et les bases délétées par rapport au consensus sont représentées par -,

 * VAR correspondant à la séquence majoritaire (variation) dans laquelle les bases conservées par rapport
15 au consensus sont représentées par ., les bases minoritaires sont représentées par atgc et les bases délétées par rapport au consensus sont représentées par - et

 * MIN correspondant aux séquences minoritaires (exception) dans lesquelles les bases conservées par rapport à la séquence majoritaire sont représentées par . et les bases délétées par rapport au consensus par -

 ainsi que la traduction de la séquence majoritaire, selon Fig 9B, dans laquelle la légende est la
25 suivante :

an: acides nucléiques:

 - en gras, caractères de petites tailles: les sites de restriction des amorces
 - en gras, caractères majuscules, extrémité 3' des
30 amorces
 - en souligné, la séquence nucléique majoritaire codante

prot: séquence protéique:

 - en souligné: acides aminés codés par les amorces
35

EXEMPLE 1 : OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-2A, PAR AMPLIFICATION DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR UNE PREPARATION DE VIRION ISSUE DE LA LIGNEE LM7.

5 L'approche moléculaire a consisté à utiliser une technique PCR permettant d'amplifier une région relativement conservée du gène pol des rétrovirus exogènes et endogènes, mais aussi des virus codant pour une enzyme à activité transcriptase inverse tels que notamment le virus
10 de l'hépatite B, qui a été publiée par Shih et coll. (Shih A., Misra R., and Rush M.G. Detection of multiple, novel reverse transcriptase coding sequences in human nucleic acids : relation to primate retroviruses. J. Virol. 1989 ; 63, 64-75). Cette technique a été utilisée sur l'ARN
15 extrait d'une préparation de virions purifiés, obtenus selon le protocole décrit ci-après, à partir des surnageants de la culture LM7 d'origine (Perron et coll. Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561) gardés congelés à -80°C depuis lors : les surnageants de cultures sont collectés
20 deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 tpm pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite congelés à -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes.

Les surnageants frais ou décongelés sont
25 centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30 % à 100 000g (ou 30 000 tpm dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2 h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virions concentrés, mais non
30 purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient de sucrose dans un tampon PBS stérile (15 à 50 % poids/poids) et ultracentrifugé à 35 000 tpm (100 000g) pendant 12 h à +4°C dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies et 20 µl sont prélevés dans chaque
35 fraction après homogénéisation pour y doser l'activité transcriptase inverse selon la technique décrite par H.

Perron et coll. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561). Les fractions contenant le pic d'activité RT de type LM7 sont ensuite diluées dans du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 35 000 tpm (1 000 000 g) pour sédimenter les particules virales. Le culot de virions purifiés ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'utilisation ultérieure qui en sera faite (Ex. Tampon Guanidium Thiocyanate pour l'extraction des ARN; PBS stérile pour le stockage à -80°C).

Préalablement à la réaction PCR, l'ARN de l'échantillon a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du Kit "cDNA synthesis system plus" (Amersham), selon les instructions du fabricant et en se basant sur une valeur approximée à un log près de la quantité d'ARN présente dans notre échantillon. Après amplification PCR selon la technique de Shih et coll., le matériel nucléaire obtenu a été déposé sur un gel avec 2 % d'agarose et la bande visualisée sous lumière ultraviolette après marquage au bromure d'éthidium dans une région de poids moléculaire d'environ 100 paires de bases a été découpée et les acides nucléiques contenus, extraits selon le protocole usuel (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989), puis clonés en utilisant le kit TA cloning KIT® (British Biotechnology) et les procédures conseillées dans les protocoles joints au kit, puis séquencés, tel que décrit ci-après : les produits issus de la purification sur gel d'agarose sont resuspendus dans 10ml d'eau distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à l'extrémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning™ (British Biotechnology). Les 2 µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1 µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X

LIGATION BUFFER", 2 μ l de "pCRTM VECTOR" (25 ng/ml) et 1 μ l de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions du kit TA Cloning® (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989). Le plasmide de chaque colonie recombinante a été coupé par une enzyme de restriction appropriée et analysé sur gel d'agarose. Les plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning kit. La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "automatic sequencer", modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Les séquences obtenues ont ensuite été analysées à l'aide des logiciels Mac Vector® et Geneworks® sur banque de données informatiques Genbank®, pour les séquences nucléiques, et Swiss Prot®, pour les séquences en acides aminés déduites des trames de lecture mises en évidence dans les séquences nucléiques. L'analyse des séquences obtenues à partir d'échantillon viral provenant des surnageants LM7 décongelés et purifié au pic d'activité transcriptase inverse sur gradient de saccharose, a mis en évidence trois catégories de séquences. Une première catégorie, correspondant à des associations artéfactuelles

des amorces nucléiques utilisées pour l'amplification PCR, une deuxième catégorie correspondant à des séquences sans trame de lecture ouverte consistante et une troisième catégorie correspondant à des séquences rétrovirales dans la région "pol" attendue de par les amorces utilisées, et
5 présentant au moins une trame de lecture ouverte conséquente.

Dans cette troisième catégorie, on a pu distinguer des séquences strictement homologues à des souches du murine leukaemia virus qui ont été retrouvées par la même
10 approche méthodologique, dans des tubes témoins ne mettant en présence que de l'eau et l'enzyme transcriptase inverse du Moloney-murine leukaemia virus utilisée pour la synthèse de l'ADNc. Il est apparu évident que ces
15 séquences provenaient de contaminants nucléiques associés à cette enzyme de rétrovirus murin utilisée pour cette étape réactionnelle. On a pu aussi y distinguer des séquences représentées par un nombre de clones allant de un à trois, et strictement homologues à des rétrovirus
20 endogènes humains connus. Ces mêmes séquences ont été détectées dans des échantillons témoins ne provenant pas de SEP, traités dans les mêmes conditions. Enfin, on a aussi pu y distinguer une séquence représentée par une population majoritaire de clones (environ 42 % des
25 clones), relativement à la représentativité individuelle des autres séquences (toujours inférieure à 5 %, voire 10 % pour un petit nombre), et présentant des homologies partielles avec des rétrovirus connus dans la région "pol" attendue. L'interrogation de la banque de données
30 Genbank® actualisée à ce jour (version 79, novembre 93) n'a pas permis de mettre en évidence de séquence identique ou présentant des homologies significatives.

Cette séquence est présentée dans la figure 1. Elle présente un cadre de lecture ouvert en phase avec les
35 deux amorces PCR retrouvées aux extrémités mais elle est plus courte que l'ensemble des séquences rétrovirales

connues dans la région attendue entre ces amorces. Une "délétion" de 45 paires de bases (15 acides aminés) y est observée à la suite de la séquence de l'amorce "amont", comme cela est présenté dans la figure 2, alors que les 5 séquences précédant l'amorce "aval" sont présentes. Cependant la trame de lecture est ouverte et ininterrompue sur toute la séquence incluant les amorces et la séquence en acides aminés déduite présente une homologie significative avec la région correspondante des rétrovirus 10 connus, comme cela est présenté dans la figure 2. Dans la séquence interne aux amorces PCR, les acides aminés E, R, Q, P et D, normalement assez bien conservés dans cette région pol des rétrovirus et des virus avec activité transcriptase inverse connus (Shih et coll. J. Virol. 15 1989; 63, 64-75) sont retrouvés conservés aux bonnes positions dans la trame de lecture de notre séquence originale.

Etant donné que cette séquence est suffisamment divergente des séquences rétrovirales déjà décrites dans 20 les banques de données on peut avancer qu'il s'agit d'une séquence appartenant à un nouveau virus que nous nommerons MSRV-2A. Ce virus s'apparente à priori, d'après l'analyse des séquences obtenues, à un rétrovirus, mais, étant donnée la technique utilisée pour obtenir 25 cette séquence, il pourrait aussi s'agir d'un virus à ARN dont le génome code pour une enzyme qui possède accessoirement une activité transcriptase inverse comme c'est le cas, par exemple, pour le virus de l'hépatite B, HBV (Shih et coll. J. Virol. 1989; 63, 64-75).

30

EXEMPLE 2 : OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-2B, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR DES PREPARATIONS DE VIRIONS ISSUES DES LIGNEES LM7 ET PLI-2.

35 Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Shih et coll. a été utilisée. Cette technique permet,

par traitement de tous les composants du milieu réactionnel par la DNase, d'éliminer toute trace d'ADN contaminant. Elle permet parallèlement, par l'utilisation d'amorces différentes mais chevauchantes dans deux séries successives de cycles d'amplifications PCR, d'augmenter les chances d'amplifier un ADNc résultant d'une quantité d'ARN faible au départ et encore réduite dans l'échantillon par l'action parasite de la DNase sur l'ARN; ce, d'autant plus la DNase est utilisée dans des conditions d'activité en excès qui permettent d'éliminer toute trace d'ADN contaminant avant inactivation de cette enzyme restant dans l'échantillon par chauffage à 85°C pendant 10 minutes. Par ailleurs, cette variante de la technique PCR décrite par Shih et coll, a été utilisée sur des fractions de virions, purifiés, comme décrit dans l'exemple 1, comme précédemment pour les surnageants congelés des cultures LM7, issus cette fois de lignée lymphoblastoïde B spontanée provenant d'un nouveau cas de SEP, de la culture PLI-2 (ECACC n° 92072201) et de la culture LM7PC (ECACC n°93010817), ces deux dernières cultures ayant été obtenues selon les méthodes ayant fait l'objet du brevet n° WO 93/20188.

Après clonage avec le TA cloning kit® des produits amplifiés par cette technique et analyse de la séquence à l'aide du séquenceur automatique selon ce qui est décrit dans l'exemple 1, les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel Geneworks®, sur la dernière version (79, novembre 93) à ce jour de la banque de données Genbank®.

Cette technique a d'abord été appliquée à deux fractions de virions purifiés sur saccharose à partir de l'isolat "POL-2" produit par la lignée PLI-2 d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG produit par la lignée LM7PC d'autre part. Les séquences clonées et séquencées à partir de ces deux échantillons correspondent à quatre catégories. Une première catégorie de séquence (type 1),

correspond à des séquences amplifiées à partir de matériel
nucléique rétroviral contaminant la transcriptase inverse
du MoMuLV utilisée pour l'étape de synthèse de l'ADN
complémentaire, ainsi que cela a déjà été signalé
5 précédemment. La deuxième catégorie (type 2), retrouvée
dans la majorité des clones (55 % des clones issus des
isolats POL-2 des culture PLI-2, et, 67 % des clones issus
des isolats MS7PG des cultures LM7PC) correspond à une
famille de séquences "pol" proches mais différentes du
10 rétrovirus endogène humain dénommé ERV-9 ou HSERV-9. La
troisième catégorie (type 3) correspond à des séquences
très fortement homologues à la séquence attribuée au virus
nommé MSRV-2A et obtenue précédemment à partir des
surnageants de culture LM7 (voir exemple 1) par la
15 technique non modifiée de shih et coll. Cependant la
proportion des clones de cette catégorie est inférieure à
celle qui a été trouvée précédemment sur l'isolat viral
issu de la culture LM7 (5 % des clones issus des isolats
POL-2 des culture PLI-2, et, 6 % des clones issus des
20 isolats MS7PG des cultures LM7PC). La quatrième catégorie
correspond à diverses séquences trouvées généralement en
un exemplaire, ainsi qu'une de type rétroviral endogène,
cependant jamais retrouvées par d'autres approches ou dans
d'autres échantillons provenant de culture exprimant une
25 activité transcriptase inverse de type LM7.

La troisième catégorie de séquences obtenues dans
cette expérience, est identique aux séquences "pol" de type
MSRV-2A obtenues précédemment, à quelques mutations près
qui peuvent s'expliquer par une variabilité normale du
30 génome viral et par des erreurs des enzymes transcriptase
inverse et taq-polymérase utilisées dans cette technique.
Cependant, lors de cette deuxième approche utilisant une
modification de la technique décrite par Shih et coll.,
une duplication a priori artéfactuelle de l'amorce aval
35 ("amorce 3') a été observée. Ceci peut provenir de la
configuration des amorces chevauchantes utilisées pour les

deux séries de cycles d'amplification PCR (technique "semi-nested"). La séquence consensus de ces clones est présentée dans la figure 3. La trame de lecture fonctionnelle correspondante, une représentation de la duplication de l'amorce aval (amorce 3') ainsi que la séquence acides aminés visualisant le motif interne aux régions conservées dans la plupart des rétrovirus (VLPQG et YVDD) sont présentées dans la figure 4. Une comparaison des séquences acides aminés de type MSRV-2 obtenues lors de cette expérience et lors de la précédente fait apparaître une différence notable dans la région communément clonée, à savoir le remplacement de la méthionine M retrouvée dans la région de l'amorce PCR par une valine V, substituant ainsi le motif YVDD, au motif YMDD (voir figure 5).

L'analyse dans les banques de données de cette dernière séquence, obtenue par cette technique modifiée sur des échantillons viraux distincts, ne modifie en rien le fait qu'aucune homologie significative n'est trouvée avec des séquences déjà répertoriées dans la base de données Genbank®. Cependant, une analogie certaine de la séquence acides aminés avec la région équivalente des rétrovirus connus existe, ainsi que cela est présenté dans la figure 6. Cette analogie fait intervenir, comme dans les clones issus de la technique précédente, une délétion suivant l'amorce amont. Cette séquence est, ici aussi, compatible avec un génome rétroviral inconnu ou avec un génome viral ARN (transcrit en ADNc dans notre protocole) codant pour une enzyme ayant une activité transcriptase inverse. En effet, les virus de l'hépatite B et de la mosaïque du choux-fleur (CaMV) qui ne sont pas des rétrovirus mais qui possèdent une polymérase à activité transcriptase inverse ont pu être amplifiés selon la technique de Shih et coll. De plus, comme cela est aussi montré dans la figure 6, le CaMV (clone CaMV QG-YM) possède une délétion dans cette région mais, contrairement

à notre séquence de type MSRV-2, elle se situe du côté de l'amorce aval (amorce 3').

**EXEMPLE 3 : OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE
5 FAMILLE MSRV-2B, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES
REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR DES PREPARATIONS
DE LYMPHOCYTES B D'UN NOUVEAU CAS DE SEP.**

Enfin, la même technique PCR modifiée d'après la technique de Shih et coll. a été utilisée pour amplifier
10 et séquencer le matériel nucléaire ARN présent dans une fraction de virions purifiés au pic d'activité transcriptase inverse "de type LM7" sur gradient de saccharose, selon les protocoles décrits dans l'exemple 1, à partir d'une lignée lymphoblastoïde spontanée, obtenue
15 par auto-immortalisation en culture de lymphocytes B d'un patient SEP séropositif pour le virus d'Epstein-Barr (EBV) après mise en culture des cellules lymphoïdes sanguine dans un milieu de culture approprié contenant une concentration appropriée de cyclosporine A. Une
20 représentation de l'activité transcriptase inverse dans les fractions de saccharose prélevées sur un gradient de purification des virions produits par cette lignée (Duc.) est présentée dans la figure 7. De même, les surnageants de culture d'une lignée B obtenue dans les mêmes
25 conditions à partir d'un témoin exempt de sclérose en plaques ont été traités dans les mêmes conditions et le dosage de l'activité transcriptase inverse dans les fractions du gradient de saccharose s'est avéré négatif partout (bruit de fond) comme illustré à la figure 8. La
30 fraction 3 du gradient correspondant à la lignée B de SEP et la même fraction sans activité transcriptase inverse du gradient témoin non-SEP, ont été analysées par la même technique RT-PCR que précédemment, dérivée de Shih et coll., suivie des mêmes étapes de clonage et de
35 séquençage, comme décrit dans l'exemple 1.

L'analyse des clones recombinants prélevés au hasard a fourni quatre catégories de séquences : une première catégorie de séquence (type 1), correspond à des séquences amplifiées à partir de matériel nucléaire rétroviral contaminant la transcriptase inverse du MoMuLV utilisée pour l'étape de synthèse de l'ADN complémentaire. La deuxième catégorie (type 2), correspond à une famille de séquences "pol" proches mais différentes du rétrovirus endogène humain dénommé ERV-9 ou HSERV-9.

La quatrième catégorie correspond à diverses séquences trouvées généralement en un exemplaire, ainsi qu'une de type rétroviral endogène, cependant jamais retrouvées par d'autres approches ou dans d'autres échantillons provenant de culture exprimant une activité transcriptase inverse de type LM7. Les résultats sont présentés dans le tableau annexé. Il est tout à fait notable que les séquences de type MSRV-2 soient retrouvées dans le seul matériel associé à un pic d'activité transcriptase inverse "de type LM7" provenant de la lignée lymphoblastoïde B de SEP. Ces séquences n'ont pas été retrouvées avec le matériel de la lignée lymphoblastoïde B témoin (non-SEP) dans 26 clones recombinants pris au hasard. Seules les séquences contaminantes de types MoMuLV et des séquences sans analogie rétrovirale particulière ont été retrouvées chez ce témoin. La différence de résultats est à l'évidence hautement significative (χ^2 , $p < 0,001$). L'analyse des séquences de type MSRV-2 obtenues à partir de la lignée B de ce patient SEP est présentée dans la figure 9. L'analyse des séquences de type MSRV-2 obtenues dans toutes les fractions de virions purifiées provenant respectivement des cultures LM7, LM7PC, PLI-2 et de la lignée lymphoblastoïde B de SEP (Duc.), par les deux techniques PCR dérivée de la technique publiée par Shih et coll., est présentée dans la figure 5. On y constate que la séquence en acide nucléique y est très conservée, à quelques

mutations près, et que la seule variation de séquence acide aminés observée dans ces clones concerne la méthionine ou la valine du site amorce 3' YMDD/YVDD.

TABEAU

**REPARTITION DES SEQUENCES OBTENUES PAR PCR
MODIFIEE D'APRES SHIH ET COLL. A PARTIR DE CULTURE-
DE LYMPHOCYTES B D'UN PATIENT ATTEINT DE SCLEROSE
EN PLAQUES VERSUS UN PATIENT CONTROLE**

	TYPE 1	TYPE 2	TYPE 3 MSRV-2B	TYPE 4
Lympho B patient SEP	0 0%	11 48%	4 17%	8 35%
Lympho B patient non SEP	5 19%	0 0%	0 0%	21 81%

REVENDEICATIONS

1/ Virus, possédant une activité transcriptase inverse, associé à la sclérose en plaques, contenu dans une souche virale possédant une activité transcriptase inverse, choisie parmi les souches dénommées respectivement POL-2, déposée le 29.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, et MS7PG déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, autre que le virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, et dont au moins une partie de la séquence POL présente une homogie avec la même région POL du virus endogène ERV9 ou HSERV9, contenu dans chacune des mêmes souches, et parmi les souches variantes consistant en des virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre desdits virus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées, autre que le virus humain précité.

2/ Virus, possédant une activité transcriptase inverse, associé à la sclérose en plaques, produit par une lignée cellulaire choisie parmi les lignées cellulaires dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201 et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, autre que le virus humain, possédant une activité transcriptase inverse, et dont au moins une partie de la séquence POL présente une homogie avec la même région POL du virus endogène ERV9 ou HSERV9, produits par chacune des mêmes lignées, et parmi les cultures cellulaires infectées susceptibles de produire un virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus produits par les lignées PLI-2 et LM7PC précitées, autre que le virus humain précité.

3/ Virus caractérisé en ce que son génome comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

5 4/ Virus caractérisé en ce que son génome code pour une séquence peptidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

10 5/ Fragment nucléotidique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec la SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

15 6/ Fragment nucléotidique, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

20 7/ ARN ou ADN et notamment vecteur de répllication, comprenant un fragment selon la revendication 5 ou 6.

25 8/ Amorçe spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN spécifique d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie d'un fragment selon la revendication 5 ou 6.

 9/ Amorçe selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle a de 10 à 30 nucléotides.

30 10/ Sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou un ADN spécifique d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une
35 partie d'un fragment selon la revendication 5 ou 6.

11/ Sonde selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle a au moins 10 nucléotides.

12/ Utilisation d'une sonde selon la revendication 10 ou 11 ou d'une amorce selon la revendication 8 ou 9, pour détecter et/ou identifier, dans un échantillon biologique, un virus associé à la sclérose en plaques.

13/ Composition thérapeutique antisens notamment pour le traitement de la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 10 ou 11.

14/ Procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, ou leur ARN et/ou ADN complémentaire, à au moins une sonde selon la revendication 10 ou 11.

15/ Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que avant d'exposer l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaire, à la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce selon la revendication 8 ou 9 et on amplifie ledit ARN et/ou ADN.

16/ Peptide codé par la séquence nucléotidique du génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il est codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique selon la revendication 5 ou 6.

17/ Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide selon la revendication 16.

18/ Oligopeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins cinq aminoacides contigus du peptide selon la revendication 16.

19/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un peptide selon la revendication 16, ou au moins une protéine selon la revendication 17 ou au moins un oligopeptide selon la revendication 18.

20/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique
et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend
un ligand spécifique à un peptide selon la revendication
16, ou à une protéine selon la revendication 17, ou à un
5 oligopeptide selon la revendication 18.

FIG 1

pol SHIH TGGAAAGTGT TGCCACAGGG CGCTGAAGCC TATCGCGTGC AGTTGCCCGA 50
pol SHIH TCGCGCCTAT AGCCTCTACA TGGATGACAT CCTGCTGGCC TCC 93

FIG 2

Trad. amorces	WKVLPQG	YMDILLAS	
Trad pol SHIH	WKVLPQG-----AEAYEVQLPDAAYSLYMDILLAS		31
HILV1 QG-YM	VLPQGFKNSTPLFEMOLAHILQPIROAFPOCTILOQYMD		
HILV2 QG-YM	VLPQGFKNSTPLFEQQLAAVINPMRMFPSTITVOYMD		
HIV1 QG-YM	VLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVTYQYMD		
HIV2 QG-YM	VLPQGWKGSPAIFQHTMROVLEPFRKANKDVIIIOYMD		
MoMuLV QG-YM	RLPQGFKNSTPLFDEALHRDLADFRIOHEDLILLOQYVD		
VISNA QG-YM	VLPQGWKLSPAVYQFTMOKILRGWIEEHRMIOFGTYMD		
CAEV QG-YM	VLPQGWKLSPSVYQFTMOETLEDWIOQHPEIQFGTYMD		
JSRV QG-YM	VLPQGMINSPTLCQKFVATAIAPVRQRFQLYLVHYMD		
MMTV QG-YM	VLPQGMINSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYTVHYMD		
MMV QG-YM	VLPQGMANSPTLCQKYVATAIHKVRHAWKQMYTIIHYMD		
HERVK QG-YM	VLPQGMINSPTICQIFVGRALQPVREKFSQCYI IHYTD		
ERV9 QG-YM	VLPQGFRDSPHLFGQALAKDLGHFSS--EGTILVLQYVD		
CaMV QG-YM	VPFGLKQAPSIFQRHMDFAFRVFRKFCV-----YVD		

FIG 3

Consensus	TTGGATCCAG TGYTGCCACA GGGCGCTGAA GCCTATCGCG TGCAGTTGCC	50
Consensus	GGATGCCGCG TATAGCCTCT ACGTGGATGA CCTSCTGAAG CTTGAG	96

FIG 4A

Consensus	TTGGATCCAG TGYTGCCACA GGGCGCTGAA GOCTATOGCG TGCAGTTGCC	50
B CG13T.....	50
E CG38C.....	50
H CG65C.....	50
Consensus	GGATGCCGCC TATAGCCTCT ACGTGGATGA CCTSCTGAAG CTTGAGTACG	100
B CG13G.....	100
E CG38C.....	100
H CG65C.....	100
Consensus	TGGATGACCT GCTGAAGCTT GAG	123
B CG13	123
E CG38	123
H CG65	123

FIG 4B

TTGGATCCAG TGYTGCCACA GGGCGCTGAA GOCTATOGCG TGCAGTTGCC	50
L D P V L P Q G A E A Y R V Q L P	
GGATGCCGCC TATAGCCTCT ACGTGGATGA CCTSCTGAAG CTTGAGTACG	100
D A A Y S L Y V D D L L K L E Y V	
TGGATGACCT GCTGAAGCTT GAG	123
D D L L K L E	

FIG 4C

Consensus	<u>TTGGATCCAG TGYTGCCACA GGGCGCTGAA GOCTATOGCG TGCAGTTGCC</u>	50
Consensus	GGATGCCGCC TATAGCCTCT <u>ACGTGGATGA CCTSCTGAAG CTTGAGTACG</u>	100
Consensus	<u>TGGATGACCT GCTGAAGCTT GAG</u>	123

FIG 4D

VLPQG GAAYRVQLPDAAYSL YVDD

FIG 5A

Consensus	TGGAAAGTGY	TGCCMCAGGG	CGCTGAAGCC	TATCGCGTGC	AGTTGCCGGA	50
LigT4	-----....A....	44
pol SHIHTA....	50
LBpatDut4	-----...TC....	44
Consensus	TGCGGCTAT	AGCCTCTACR	TGGATGACAT	CCTGCTGGCC	TCC	93
LigT4G--	-----	---	72
pol SHIHA	93
LBpatDut4G--	-----	---	72

FIG 5B

Consensus	--VLPQGAEA	YRVQLPDAAY	SLYVDD----	-	31
Trad pol SHIH	WK.....M..ILLA	S	31
Trad LigT4	24
Trad of LBpatDut4	24

FIG 6

AA conservés

VLPQG.....E..R.Q.P.....Y.D

HTLV1 QG-YM
 HTLV2 QG-YM
 HIV1 QG-YM
 HIV2 QG-YM
 MoMuLV QG-YM
 VISNA QG-YM
 CAEV QG-YM
 JSRV QG-YM
 MMIV QG-YM
 MPV QG-YM
 HERVK QG-YM
 ERV9 QG-YM

VLPQGFKNSTPLFEMQLAHILOPIROAFQCTILOQMDD
 VLPQGFKNSTPLFEQQLAAVLNPMRMKMFPTSTIVQYMDD
 VLPQGWKGSPIAFQSSMTIKILEPFRKQNPDIIVIQYMDD
 VLPQGWKGSPIAFQHTMRQVLEPFRKANKQVITIQYMDD
 RLPQGFKNSTPLFDEALHRDLADFRIGHDLILIQYVDD
 VLPQGWKLSPAVYQFTMQKILRGWIEEHMIOFGIYMDD
 VLPQGWKLSPSVYQFTMQETLEDWIQQHPEIQFGIYMDD
 VLPQGMINSPTLCQKFVATAIAPVRQRFQLYLVHYMDD
 VLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHYMDD
 VLPQGMANSPTLCQKYVATAIHKVRHAWKQMYTIHYMDD
 VLPQGMINSPTICQTFVGRALQPVREKFSQCYITHYIDD
 VLPQGFRRDSPHLFGQALAKDLGHFSS--EGILVLOQYVDD

TradMSRV-2B 2YV

VLPQG-----AEAYRVQLPDAAYS LYVDDLLKLEYVDD

TradMSRV-2B

VLPQG-----AEAYRVQLPDAAYS LYVDD

CaMV QG-YM

VPFGLKQAPSIFQRHMDFAFRVFRKFCCV-----YVDD

FIG 7

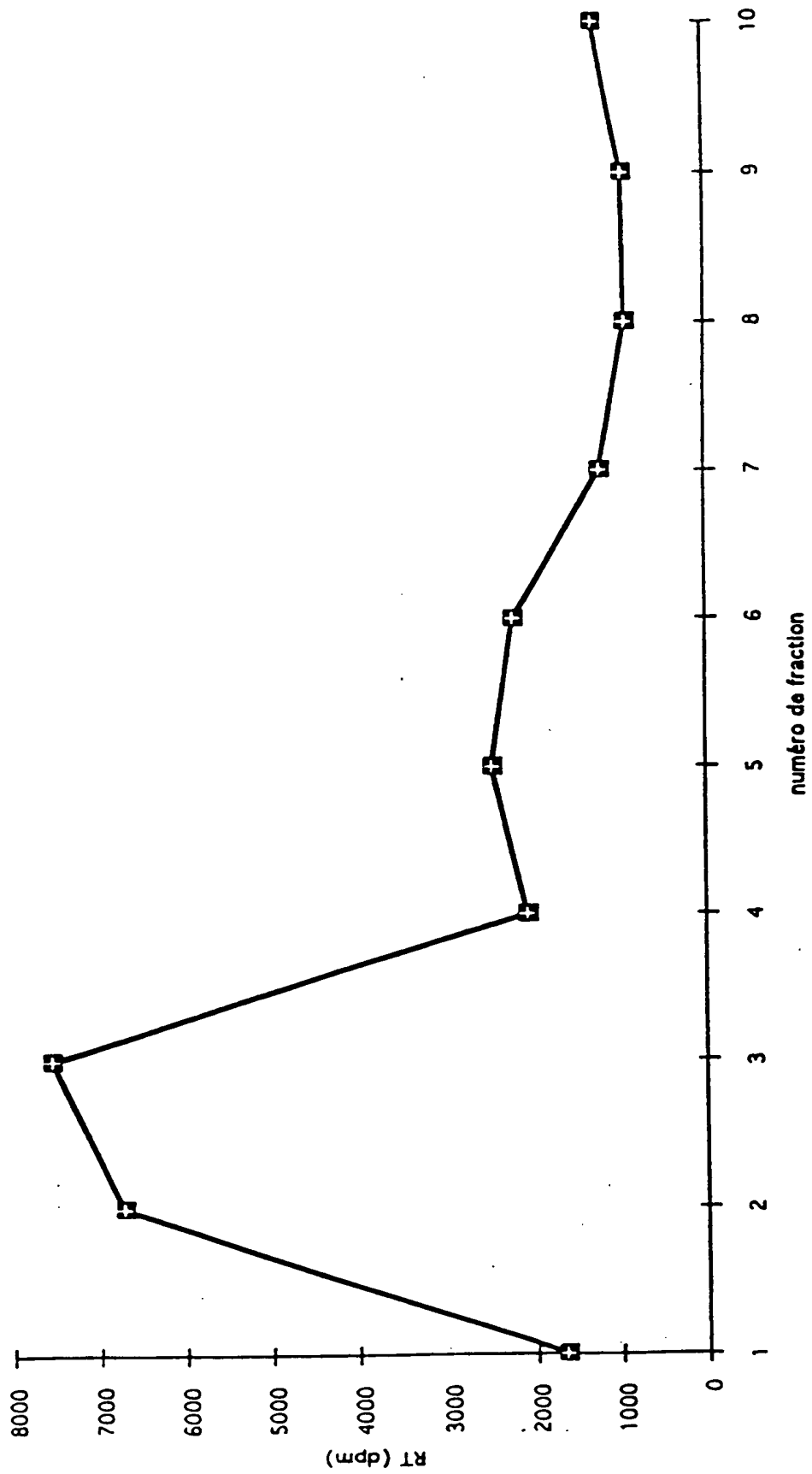


FIG 8

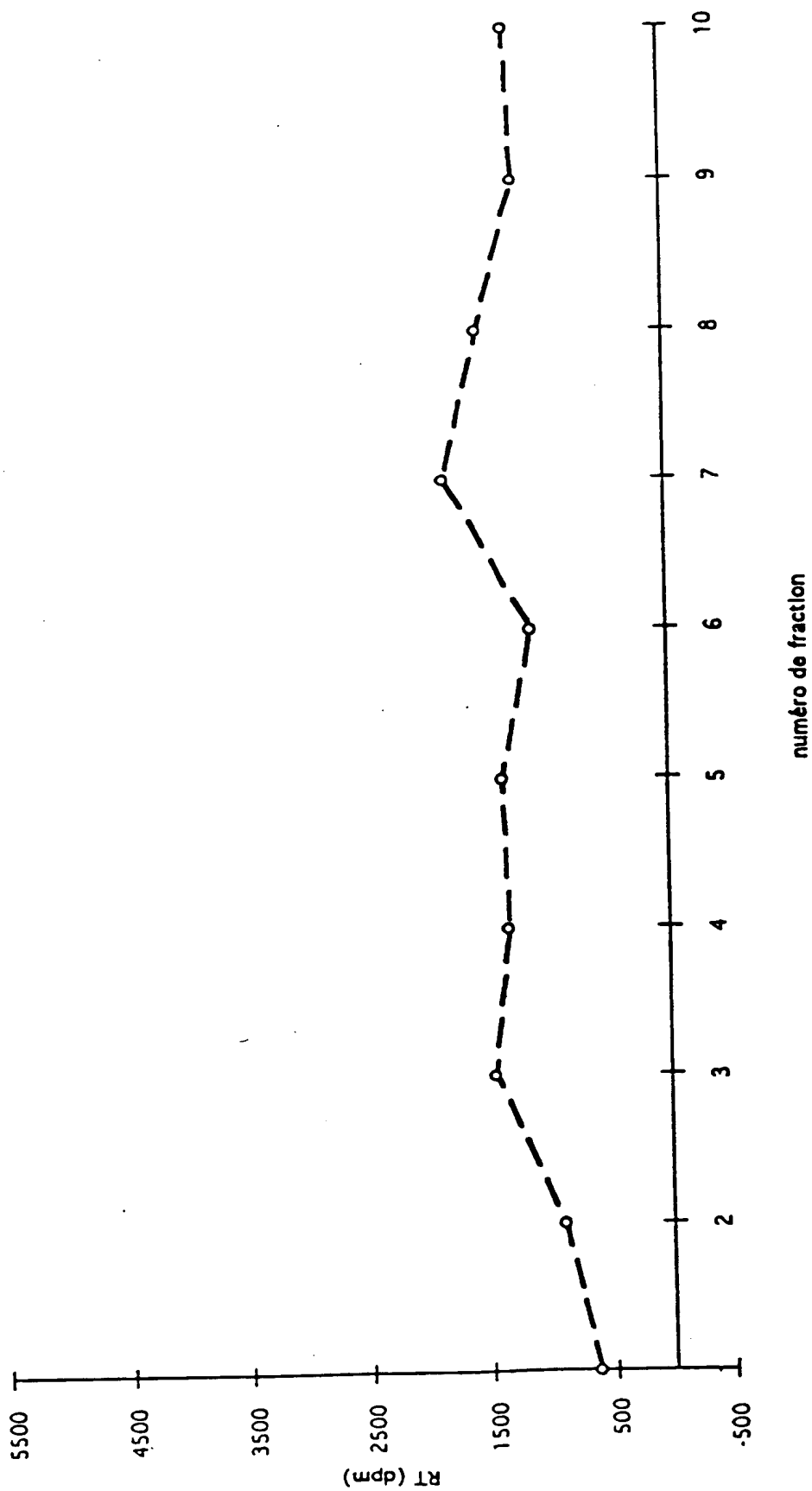


FIG 9A

Consensus	CTTGGATCCA	GNGYTMCMC	ARGGGNCCAG	GGNRTANNCC	CONICTNTYW	50
MAJ	CTTGGATCCA	GtGtTgcCaC	AgGGGtTCAG	GG-aTAGoCC	CCaTCTaTtt	50
VARc.aa.c.	.a...c.C..	..gg...a..ca	50
Consensus	GGMCAGGSTA	TTAGYCCAAG	ACTTGAKCCA	GNCTCATAAC	CTGGAACACT	100
MAJ	GGcCAGGc-A	TTAGcCCAAG	ACTTGAgCCA	GtctCATAAC	CTGGA-CACT	100
VAR	..a....gt.t.....a.....	98
Consensus	CTTGNCCTT	CGGNACGRKG	GNATGACMIN	CTGANGCTTG	AGA	143
MAJ	CTTG-TCCTT	CGGTAC-atG	G-ATGACcTy	CTGAaGCTTG	AG-	141
VARc-----gggG	.c.....a.c	CTGANGCTTG	AG-	137
MIN-----	-----	...-.....	125

FIG 9B

an	<u>CTTGGATCCA</u>	<u>GNGYTMCMC</u>	<u>ARGGGNCCAG</u>	<u>GGNRTANNCC</u>	<u>CONICTNTYW</u>	50
prot		<u>V L P O</u>	<u>G F R</u>	<u>D S P</u>	<u>H L F G</u>	
an	<u>GGMCAAGSTA</u>	<u>TTAGYCCAAG</u>	<u>ACTTGAKCCA</u>	<u>GNCTCATAAC</u>	<u>CTGGAACACT</u>	100
prot		<u>Q A L</u>	<u>A Q D</u>	<u>L S Q</u>	<u>F S Y L</u>	<u>D T L</u>
an	<u>GTCCTTCGGT</u>	<u>ACATGGATGA</u>	<u>CCTGCTGAAG</u>	<u>CTTGAG</u>		137
prot		<u>V L R Y</u>	<u>M D D</u>			

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 495573
FR 9401531

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande soumise
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	WO-A-93 20188 (BIO MERIEUX) * le document en entier *	1,2
A	AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol.8, no.5, Mai 1992 page 922 H. PERRON ET AL 'Retrovirus isolation from patients with multiple sclerosis: epiphenomenon or causative factor ?' * abrégé *	1-20
D,A	LANCET THE, vol.337, no.8745, 6 Avril 1991, LONDON GB pages 862 - 863 H. PERRON ET AL 'Isolation of retrovirus from patients with Multiple Sclerosis' * le document en entier *	1,2
A	RESEARCH IN VIROLOGY, vol.143, no.5, 1992 pages 337 - 350 H. PERRON ET AL 'In vitro transmission and antigenicity of a Retrovirus isolated from a Multiple Sclerosis patient' * le document en entier *	1,2
D,A	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol.74, 1993 pages 65 - 72 H. PERRON ET AL 'Herpes Simplex Virus ICP0 and ICP4 immediate early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomenigeal cell line from a patient with Multiple Sclerosis' * le document en entier *	1,2
--- -/-		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
7 Octobre 1994		Le Cornec, N
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication ou artifice plus technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie en principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1
EPO FORM 100 (2.0) (P/C/L)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 495573
FR 9401531

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO-A-93 07259 (SCLEROSE-FORENINGEN (THE DANISH MS-SOCIETY)) * le document en entier *	1-19
D,A	--- CURRENT CONCEPTS IN MULTIPLE SCLEROSIS, 1991, AMSTERDAM, ELSEVIER pages 11 - 116 H. PERRON ET AL 'Isolations of an unknown retrovirus from CSF, blood, and brain cells of patients with multiple sclerosis' * le document en entier *	1,2
D,A	--- NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol.19, no.7, 1991, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 1513 - 1520 G. LA MANTIA ET AL 'Identification and characterization of novel human endogenous retroviral sequences preferentially expressed in undifferentiated embryonal carcinoma cells' * le document en entier *	1,2
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (M.C.L.S)
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
7 Octobre 1994		Le Cornec, N
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un même une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie en principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>A : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1
EPO FORM LES 615 (PNCIS)